

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616-092:612.017.1]-053.31-02:618.33-006.922.1-008.64]-082.9

Д. В. Демина, И. А. Орловская, В. Ю. Матросова, О. П. Колесникова,
Л. Б. Толоркова, В. А. Козлов**ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ
ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ У МЫШЕЙ**

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Данные исследования демонстрируют влияние гипоксии матери в определенные периоды беременности на процессы кроветворения и формирования гуморального иммунного ответа у новорожденных.

Выявленные изменения в числе КОЕс (увеличение в печени и селезенке после гипоксии в I триместре, снижение в селезенке и увеличение в костном мозге после гипоксии во II и III триместрах) в зависимости от триместра беременности, в течение которого самки подвергались гипоксии, могут говорить о влиянии последней на пролиферативную активность или/и на процесс миграции стволовых кроветворных клеток. При исследовании влияния гипоксии матери на иммунный ответ у новорожденных оказалось, что в опытных группах всех трех исследуемых триместров число АСК в селезенке было снижено по сравнению со значениями у соответствующих контрольных животных. Гипоксия во II триместре оказывала более выраженное влияние на процесс формирования в онтогенезе гуморального иммунного ответа.

Maternal hypoxia was shown to influence, at certain pregnancy periods, the hematopoietic processes and the shaping of humoral immune response in newborns. The changes detected in the quantity of colony-forming frenal units (increase in the liver and spleen after hypoxia in trimester I as well as decrease in the spleen and increase in the bone marrow after hypoxia in trimesters II and III), which depend on a trimester during which the mouse females were subject to hypoxia, can be indicative of the impact produced by the factor in question on the proliferative activity and on the migration processes of stem hematopoietic cells. Studies of maternal hypoxia and its influence on the immune response in newborns showed, in posterity of all experiment-group animals (hypoxia in trimesters I, II and III, respectively), a lower number of absolute quality in the spleen versus the controls. Hypoxia observed in trimester II was found to have a more pronounced influence on shaping the humoral immune response in ontogenesis.

В эмбриональном и фетальном периодах развития принято выделять стадии, когда зародыш обладает повышенной чувствительностью к действию повреждающих факторов среды. Эти критические периоды развития характеризуются преобладанием процессов активной клеточной и тканевой дифференцировки и значительным повышением обменных процессов. Следует отметить, что повреждающее действие факторов внешней среды на эмбрион и плод практически не зависит от специфичности фактора. При всем их разнообразии, по-видимому, одним из универсальных патогенетических механизмов их повреждающего действия на плод является гипоксия.

Данные литературы о выраженном ингибирующем влиянии гипоксии на иммунную систему взрослого организма и новорожденных [2, 4, 6] служат основанием для исследования механизмов формирования иммунодефицита новорожденных под воздействием внутриутробной гипоксии в зависимости от периода повреждающего воздействия с целью определения перспектив коррекции этой патологии.

Материалы и методы. В работе использовали мышей-гибридов (СВАхС57BL)_{F₁}, полученных из питомника СО РАН (Томск), 3–6-месячного возраста. Животных содержали в условиях вивария в пластиковых клетках (по 10 особей) на сбалансированном питании и при свободном доступе к воде.

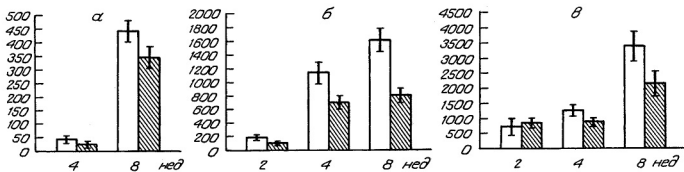


Рис. 1. Число АОК, формирующихся в ответ на введение эритроцитов барана в селезенке мышей, рожденных от матерей, подвергнутых хронической гипоксии в I (а), II (б) и III (в) триместрах беременности.

Здесь и на рис. 2 и 3: светлые столбцы — контроль; темные столбцы — гипоксия.

Беременных самок в I, II и III триместрах беременности помещали в барокамеру, где создавались условия, идентичные поднятию на высоту 6500—6700 м над уровнем моря, на 14—16 ч в течение 5 дней.

Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке оценивали на 4-е сутки после внутрибрюшинной иммунизации эритроцитами барана (0,25 мл 10% взвеси) по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом [3].

Число ранних гемопоэтических предшественников в костном мозге, селезенке и печени мышей оценивали с помощью метода определения колониеобразующих единиц селезенки (КОЕС) [5]. На 8-е сутки после трансплантации летально обученным сингенным реципиентам клеток костного мозга (10^5 клеток на 1 мышью), селезенки ($2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мышью) и печени ($2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мышью) в извлеченных селезенках подсчитывали число КОЕС-8.

Потомство, родившееся от мышей, подвергнутых влиянию гипоксии, исследовали в трех возрастных группах: 1—2, 4 и 8 нед. Контрольные животные находились в стандартных условиях вивария.

Достоверность различий оценивали по критерию *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При обследовании потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии в I триместре (опытная группа), было отмечено снижение как относительного, так и абсолютного количества АОК, формирующихся в ответ на введение эритроцитов барана, на 4-й неделе жизни по сравнению с соответствующими показателями в контроле. Через 8 нед после рождения в этой же опытной группе число АОК осталось сниженным по сравнению с контролем (рис. 1, а).

При изучении гуморального иммунного ответа (АОК) у потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии во II триместре, также наблюдалось значительное снижение как относительного, так и абсолютного количества АОК по сравнению с контролем через 2, 4 и 8 нед после рождения (рис. 1, б). У потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии в III триместре беременности, на всех сроках исследования (2, 4 и 8-я недели) выявлено снижение числа АОК (достоверное на 4-й и 8-й неделях) по сравнению с контролем (рис. 1, в). Таким образом, представленные данные свидетельствуют о снижении гуморального иммунного ответа (оцененного по количеству АОК в селезенках) у потомства мышей, подвергнутых внутриутробной гипоксии во всех триместрах беременности, более значимом для II триместра.

При изучении колониеобразующей активности клеток печени у потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии в I триместре беременности, выявлено значительное достоверное увеличение печеночных КОЕС-8 по сравнению с контролем через 5 дней и на 2-й неделе после рождения. К 4-й неделе после рождения данный показатель соответствовал контрольному уровню (рис. 2, а). Число КОЕС в печени у потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии во II триместре, было незначительно ниже, чем в контроле (рис. 2, б). При изучении колониеобразующей активности клеток печени у потомства мы-

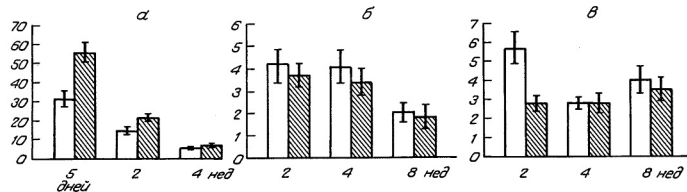


Рис. 2. Количество КОЕС-8 в печени мышей, рожденных от матерей, подвергнутых хронической гипоксии в I (а), II (б) и III (в) триместрах беременности.

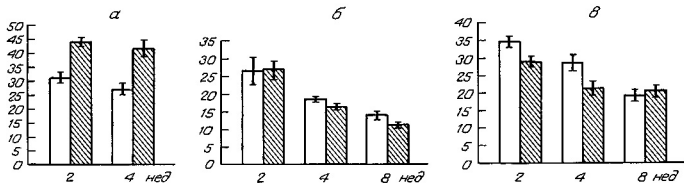


Рис. 3. Количество КОЕс-8 в селезенке мышей, рожденных от матерей, подвергнутых хронической гипоксии в I (а), II (б) и III (в) триместрах беременности.

шей, подвергнутых влиянию гипоксии в III триместре беременности, обнаружено достоверное снижение числа печеночных КОЕс у животных 2-недельного возраста по сравнению с контролем. Достоверных различий между группами мышей 4- и 8-недельного возраста не отмечено (рис. 2, в).

При оценке числа КОЕс-8 в селезенке у потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии, в I триместре отмечено значительное достоверное увеличение данного показателя на 2-й и 4-й недели жизни (рис. 3, а). Гипоксия во II триместре беременности приводила к снижению у потомства мышей числа КОЕс-8 в селезенке на 4-й и 8-й неделях жизни (рис. 3, б), а гипоксическое воздействие в III триместре вызвало снижение показателя на 2-й и 4-й неделях после рождения (рис. 3, в). Отмеченные различия исчезали к 8-й неделе жизни мышей. В то же время число КОЕс в костном мозге у потомства мышей, подвергнутых гипоксическому воздействию во II триместре, было достоверно выше, чем в контрольной группе, на 2, 4 и 8-й неделях исследования (соответственно $7,7 \pm 0,4/12,6 \pm 1,7$, $19,2 \pm 1,5/22,7 \pm 1,1$ и $8,0 \pm 0,8/11,9 \pm 0,4$). Хроническая гипоксия в III триместре не обуславливала явных тенденций в изменении колониеобразующей активности клеток костного мозга у потомства в изученные сроки (соответственно $8,1 \pm 0,7/5,8 \pm 0,7$, $10,1 \pm 0,9/13,7 \pm 0,9$ и $14,3 \pm 1,2/14,9 \pm 1,5$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии гипоксического воздействия, которому были подвергнуты мыши-самки во время беременности, на процессы кроветворения и формирования гуморального иммунного ответа у новорожденных. Выявленные изменения числа КОЕс (увеличение в печени и селезенке после гипоксии в I триместре, увеличение в костном мозге после гипоксии во II триместре) в зависимости от триместра беременности, в течение которого самок подвергали гипоксии, могут свидетельствовать о влиянии данного воздействия на пролиферативную активность (и/или) на процесс миграции стволовых кроветворных клеток (СКК). Из литературы известно о стимулирующем влиянии острой и хронической гипоксии на пролиферативную и миграционную активность СКК в организме взрослых мышей [1]. В наших исследованиях наибольшие изменения колониеобразующей активности

СКК были отмечены у потомства "группы I триместра", у которого число КОЕс в печени и селезенке соответствовало на 2-й и 4-й неделях после рождения было в 1,5 раза выше, чем в контроле. По данным литературы, в эмбриогенезе именно в течение первых 7 дней формируется гемопоэз в желточном мешке, откуда СКК мигрируют в эмбриональную печень [9]. Возможно, именно начальные этапы формирования эмбрионального гемопоэза являются наиболее чувствительными к действию гипоксии.

Нами показано, что значения числа КОЕс в костном мозге постгипоксических животных (II триместр) превышали контрольные величины, при этом одновременно имели место снижение числа КОЕс в селезенке (4-й и 8-я недели жизни) и тенденции к снижению числа печеночных КОЕс. Следует отметить, что именно во II триместре происходит закладка костно-мозгового кроветворения за счет мигрирующих в костный мозг СКК из эмбриональной печени [8]. По-видимому, гипоксия в большей степени оказывает влияние на популяцию СКК в тех органах (эмбриональная печень и костный мозг), которые на отдельных этапах онтогенеза выполняют роль центральных органов гемопоэза. Не исключено, что эти эффекты гипоксии реализуются за счет структурно-функциональных изменений в гемопозитивном микроокружении. В наших исследованиях гипоксия в III триместре беременности не оказывала выраженного стимулирующего влияния на число КОЕс у потомства. Наблюдалось небольшое увеличение содержания КОЕс в костном мозге, которое исчезало к 8-й неделе жизни мышей. Более того, при исследовании через 2 нед после рождения показатели количества предшественников гемопоэза в печени и селезенке у потомства мышей опытной группы были достоверно ниже таковых в контроле. Сейчас можно только высказать предположение о механизмах данного эффекта, тем более что указанные различия исчезали к возрасту 1 и 2 мес. Скорее всего, следует думать о подавлении пролиферативной активности СКК.

При исследовании влияния гипоксии у матери на иммунный ответ у потомства выявлено, что у животных, рожденных от матерей, подвергнутых гипоксии, число АОК в селезенках было ниже, чем в контроле; наиболее выраженные изменения на-

блюдались при гипоксии во II триместре (см. рис. 1). Из литературы известно, что воздействия, направленные на стимуляцию эритроидного роста кроветворения, в частности гипоксия, могут вызывать иммунодепрессивный эффект. Было высказано предположение, что одним из механизмов формирования иммунодепрессивного состояния при гипоксии является преимущественная эритроидная дифференцировка СКК в ущерб клеткам других ростков кроветворения, включая лимфоидные элементы [1]. В то же время нами было показано, что эритробласты обладают способностью ингибировать пролиферацию В-лимфоцитов, тем самым ингибируя продукцию антител [7].

Ранее чешским исследователем Иво Милером [4] было показано, что у взрослых крыс, которые в перинатальном периоде (1 нед пренатального и 1 нед постнатального развития) подвергались воздействию гипоксии, гуморальный иммунный ответ снижался в 2 раза по сравнению с контролем; автор выявил снижение выраженности кислородного взрыва перитонеальных макрофагов и нейтрофилов у экспериментальных животных. Следует отметить, что у "гипоксических" плодов, развивающихся в условиях патологического стресса, резко снижено содержание эритроцитов в крови в связи с ацидотической альтерацией эритропоэтической системы. Кроме того, превалирование HbF (фетального гемоглобина) в эритроцитах делает понятным высокое средство крови плода к кислороду. У физиологически незрелых плодов переход с печеночного эритропоэза на костно-мозговой происходит лишь после рождения, при этом сохраняется превалирование HbF [16]. Вполне вероятно, что все эти механизмы так или иначе имеют отноше-

ние к выявлению гипоксии в течение первых двух триместров на процесс формирования у плода иммунной системы и, в частности, его гуморального звена. В то же время снижение числа АОК, формирующихся в селезенках в ответ на иммунизацию эритроцитами барана, можно, очевидно, расценивать как формирование иммунодефицитного состояния у потомства мышей, подвергнутых хронической гипоксии в течение беременности.

Учитывая полученные данные, следует думать, что гипоксия во время беременности является одним из главных механизмов нарушения эмбрионального формирования иммунной системы, а в послеродовом периоде это может стать одной из основных причин развития вторичных иммунодефицитов у популяции часто болеющих детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аршавский И. А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. — М., 1982.
2. Козлов В. А., Журавкин И. Н., Цырлова И. Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. — Новосибирск, 1982.
3. Матросова В. Ю., Орловская И. А., Козлова Д. В., Козлов В. А. // Бюл. exper. биол. — 2000. — Т. 129, № 6. — С. 604—666.
4. Милер И. Иммуниетт человеческого плода и новорожденного. — Прага, 1983.
5. Цырлова И. Г., Чеглакова В. В., Козлов В. А. // Онтогенез. — 1985. — Т. 16, № 6. — С. 143—148.
6. Cunningham A. J., Szenberg A. // Immunology. — 1968. — Vol. 14, N 4. — P. 599—600.
7. Orkin S. H. // Curr. Opin. Cell Biol. — 1995. — Vol. 7, N 6. — P. 870—877.
8. Till J. E., McCulloch E. A. // Radiat. Res. — Vol. 14. — P. 213—222.
9. Vizek, Dostal M., Soukupova D. // Physiol. Res. — 1993. — Vol. 42. — P. 201—205.

Поступила 15.07.03